บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment Incubator Shaker) ของ New Brunswich Scientific Co., U.S.A.

1.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Spectronic 21) ของ Bausch & Lomb

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) แบบ Sp-5A ของ Suntex

1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) แบบ J2-21 ของ Bechman, U.S.A.

1.5 ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 2 ลิตร แบบ KMJ-2-B ของ Mituwa Rikagaku kogyo Co., Japan

1.6 เครื่องวิเคราะห์น้ำตาล (Industrial Analyzer YSI Model 27) ของ Yellow Springs Instrument Co., U.S.A.

1.7 เครื่องบดหยาบ (Disk Mill) ของ Glay Adam

1.8 เครื่องบดละเอียด (Pulverizer) ของ Gallenkamp

2. เคมีภัณฑ์

2.1 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) จาก Trichoderma reesei และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จาก Aspergillus niger บริษัท NOVO ประเทศไทย

2.2 แอลฟา-เซลลูโลส (∝-cellulose fiber, 99.5% pure) ของบริษัทซิกม่า

2.3 คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (Carboxymethyl Cellulose, sodium salt, low viscosity) ของบริษัทซิกม่า

2.4 ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัทซิกม่า

2.5 บิวทานอล (n -Butanol) ของบริษัท May & Baker, อังกฤษ

2.6 อาซีโตน (Acetone) ของบริษัท BDH Chemicals, อังกฤษ

2.7 เอธานอล (Ethanol) ของบริษัท Carlo Erba, อิตาลี

2.8 กรดบิวทีริค (Butyric Acid) ของบริษัท Merch

2.9 กรดอะเซติก (Aceticc Acid) ของบริษัท Carlo Erba, อิตาลี

3. การเตรียมผักตบชวาและฟางข้าวเพื่อใช้ในการย่อยสลายตัวเอนไซม์

3.1 การเตรียมผักตบชวา

นำผักตบชวาที่เก็บจากบ่อปลา มาล้างด้วยน้ำประปาหลายครั้งจนสะอาดนำมาตากให้แห้งกลางแดด 1 วัน จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ละเอียดด้วยเครื่องบดหยาบ และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh และบางส่วนนำไปผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh เก็บไว้ทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

3.2 การปรับสภาพเบื้องต้นโดยวิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ

นำผักตบชวาที่คัดขนาดแล้ว ขนาด 40 mesh 1 ส่วน มาผสมสารละลายต่อไปนี้ 20 ส่วน

3.2.1 กรณีใช้กรดในการปรับสภาพ

ใช้สารละลายไฮโดรคลอริก 1-5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง

3.2.2 กรณีใช้ด่างร่วมกับความร้อนในการปรับสภาพ

ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์เข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-30 นาที

นำผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มากรองผ่านผ้าขาวละเอียดล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น จนกระทั่งน้ำที่ออกมามีความเป็นกรดด่าง 7 จากนั้นนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และทำให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด และผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh

3.3 การปรับสภาพเบื้องต้น โดยวิธีทางกายภาพ

ในกรณีใช้ไอน้ำที่ความดันต่ำ

นำผักตบชวาที่คัดขนาดแล้วขนาด 40 mesh มาอบด้วยไอน้ำในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ถึง 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ

ผักตบชวามาล้าง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และทำให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด แล้วผ่านตะแกรงร่อนขนาด 80 mesh

4. การหาความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์

4.1 การหาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรองโดยใช้วิธีของ Mandel และ Sternbery (10)

ผสม 1.0 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มล. ของสารละลาย 0.05 โมลาร์อะซีเตรทบัฟเฟอร์ 4.8 ในหลอดทดลองที่บรรจุกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 560 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไดไนไตรซาลิไซลิก (3, 5-dinitrosalicylic acid) 3 มล. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ตามวิธีในข้อ 5

1 หน่วยของเอนไซม์ (FPU) คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

4.2 การหาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายอนุพันธ์เซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) ตามวิธีของ Ryu และ Mandel (66)

ส่วนผสม 1.0 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มล. ของ 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ในสารละลาย 0.05 โมลาร์อะซีเตรทบัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายแล้วได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

4.3 การหาความสามารถของเอนไซม์ (Salicinase หรือ β - glucosidase) ในการย่อยสลายซาลิซิน ตามวิธีของ Ryu และ Mandel (66)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 1.0 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มล. ของ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซาลิซินในสารละลาย 0.05 โมลาร์อะซีเตรทบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของกลูโคสต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (10)

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก DNS (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข หมายเลข 1) 3 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด เติมน้ำกลั่น 10 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อ มล.

6. การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

ชั่งน้ำหนักผักตบชวาและอบให้แห้ง เพื่อให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน เติมสารละลายอะเซติก-ไนตริก (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข หมายเลข 3) 5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป reflux เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที รินส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เติม 67 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก 10 มล. แช่ย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 1 มล. แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล. ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วมา 1 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 5 มล. แช่ย่าให้เข้ากัน ดูดมา 1 มล. ผสมกับ 5 เปอร์เซ็นต์ หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่น้ำแข็งจนเย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้แอลฟา-เซลลูโลสหนัก 0.05, 0.25 กรัม แทนสารตัวอย่าง

7. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์

บ่มผักตบชวาที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตรทบัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเบต้า-กลูโคซิเดส 20 หน่วย ต่อกรัมผักตบชวา บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีในข้อ 5 ที่เวลา 0, 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในภาคผนวก ค. ข้อ 1

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดส

8.1 การศึกษาหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการย่อยสลายผักตบชวา

บ่มผักตบชวาที่ได้รับการปรับสภาพโดยกรรมวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 9 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ อันได้แก่ อะซีเตรท, ซิเตรทฟอสเฟต และซิเตรท ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ในปริมาณ 20 หน่วย FPU ต่อกรัมผักตบชวาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในข้อ 5 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในภาคผนวก ค. ข้อ 1

8.2 การศึกษาหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยสลายผักตบชวา

ดำเนินการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 8.1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 8 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 3-7 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

8.3 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายผักตบชวา

ดำเนินการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 8.2 โดยแปรผันอุณหภูมิที่บ่มในช่วง 40-70 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์

9. การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยสลายผักตบชวา

นำผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 7 มาทำให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองแบบเดียวกับข้อ 8 แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 10-60 หน่วยเอนไซม์ FPU ต่อกรัมผักตบชวา วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตามเวลา และหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยวัดเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสตามวิธีในภาคผนวก ค ข้อ 1 และ 2 ตามลำดับ

10. การศึกษาผลของการเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อการย่อยสลายผักตบชวา

ทำการทดลองโดยสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกับข้อ 9 แต่เพิ่มความเข้มข้นของเอมไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสระหว่าง 10-60 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมผักตบชวา โดยให้ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสคงที่ วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตามเวลา คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดตามข้อ 9

11. การศึกษาผลของความเข้มข้นผักตบชวาต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การทดลองแปรผันปริมาณผักตบชวาในช่วง 1-30 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่หาได้จากข้อ 10 และความเข้มข้นเอนไซม์จากข้อ 8 เปรียบเทียบผลของน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นตามเวลา

12. จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

1. Clostridium No. 8p-2 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย
2. คลอสตริเดียมสายพันธุ์จากต่างประเทศ คือ

NRRL B592 Clostridium butylicum United States Department of Agriculture 1815 North University 3t. Peoria, Illinoid 61604.

ATCC 824 Clostridium acetobutylicum Americam Type Culture Collection 12301 Pask Lawn Drive Rock, Maryland, U.S.A.

13. การวิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทีริค โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี่

ใช้แก๊สโครมาโตกราฟี่ของ Shimadzu Model Gc 7AG กับ recorder integrator ของ Chromatopac CR1A เมื่อทำการวิเคราะห์

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

คอลัมน์ยาว 2 เมตร ขนาด 1/8 นิ้ว บรรจุด้วย porapak Q 80-100 mesh อุณหภูมิคอลัมน์คงที่ที่ 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector) 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (detector) 300 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของผลิตภัณฑ์หาได้จากการเทียบพื้นที่ใต้พีค (peak) ของสารที่ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ (extermal standard) โดยที่บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทีริค มีรีเทนชันไทม์ (retention time) เป็น 4.09, 1.77, 1.31, 3.10 และ 9.96 ตามลำดับ

14. การเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายที่เกิดขึ้น

ใช้หลอดฉีดยาดูดน้ำหมักที่ต้องการวัดมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็ก นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) อัตราการหมุน 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาดเล็กมีฝาปิดหยดกรดเกลือเข้มข้น 1 หยด นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดและตัวทำละลายโดยแก๊สโครมาโตกราฟี่

15. การวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นจากการหมัก

วัดโดยการแทนที่น้ำจากเครื่องวัดแก๊ส ซึ่งจะทำการนับจำนวนครั้งของแก๊สที่เข้าไปต่อปริมาตรที่กำหนด คำนวณหาปริมาตรแก๊สที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการหมักโดยมีค่าเท่ากับผลคูณของจำนวนครั้งที่เครื่องนับกับปริมาตรที่กำหนดไว้

16. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

นำอลูมินัมฟอยล์ที่จะใช้หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ไปอบแห้งในตู้อบแห้ง 105 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์ (dessicator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วย เครื่องชั่งที่ละเอียดถึง 0.01 มิลลิกรัม จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งเซลล์ที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งในภาชนะดังกล่าวข้างต้น นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้ง

17. การเลี้ยงคลอสตริเดียมในอาหารที่มีน้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา

ใช้ลูบ (loop) ถ่ายสปอร์ของเชื้อคลอสตริเดียม ในข้อ 12 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บรรจุในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิด นำไปทำ heat shock โดยนำหลอดไปจุ่มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-4 วัน ให้เชื้อสร้างสปอร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

18. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์เพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในระดับหลอดทดลอง

ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดเชื้อคลอสตริเดียมที่เตรียมไว้จากข้อ 17 มา 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่มีน้ำตาลจากการย่อยสลาย (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร บรรจุในหลอดทดลอง 10 มล. ทำ heat shock 1 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์หาปริมาณอาซีโตน-บิวทานอล ตามวิธีในข้อ 13 และ 14

19. การศึกษาผลของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ของเชื้อคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์ในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อคลอสตริเดียมที่เตรียมไว้ในข้อ 17 มาทำ heat shock 1 นาที ถ่ายเชื้อในหลอดทดลองลงในขวดแก้วทรงกรวย ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มล. โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและอุณหภูมิที่บ่มเชื้อซึ่งได้จากข้อ 18 บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอาซีโตน-บิวทานอล

20. การเลี้ยงคลอสตริเดียมเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในระดับถังหมัก

เลี้ยงเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดเลือกได้จากข้อ 19 ในขวดแก้วทรงกรวยบรรจุอาหาร 200 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเป็นกล้าเชื้อ

(Inoculum) ถ่ายเชื้อจากขวดแก้วทรงกรวยลงในถังหมัก ซึ่งบรรจุอาหารที่มีน้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) อัตราการกวนเป็น 100 rpm.

21. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในถังหมัก

21.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เลี้ยงคลอสตริเดียมตามวิธีการในข้อ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) แต่ผันแปรอุณหภูมิเป็น 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 วิเคราะห์ปริมาณ อาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทีริค ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งปริมาณเซลล์และปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นตามช่วงเวลาของการหมัก พร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์และค่าจลน์ศาสตร์ต่าง ๆ ตามภาคผนวก ค. หมายเลข 3 และ 4

21.2 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เลี้ยงคลอสตริเดียม ตามวิธีการในข้อ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ผันแปรโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5, 6.0, 6.5 และไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม และวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นตามช่วงเวลาของการหมัก พร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์และค่าจลน์ศาสตร์ต่าง ๆ ตามภาคผนวก ค. หมายเลข 3 และ 4

21.3 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เลี้ยงคลอสตริเดียม ตามวิธีการในข้อ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) แต่ผันแปรความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมตามข้อ 21.2 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาณแก๊สที่เกิดตามช่วงเวลาของการหมัก พร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์และค่าจลน์ศาสตร์ต่าง ๆ ตามภาคผนวก ค. หมายเลข 3 และ 4